

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-208754

(43)Date of publication of application : 03.08.2001

(51)Int.Cl. G01N 33/53
C08L101/14
C12N 15/09
C12Q 1/26
C12Q 1/68
G01N 21/78
G01N 33/544
G01N 33/545
G01N 33/566

(21)Application number : 2000-016843 (71)Applicant : KATAOKA KAZUNORI

(22)Date of filing : 26.01.2000 (72)Inventor : KATAOKA KAZUNORI
NAGASAKI YUKIO
HORI HIROYOSHI
AKIYAMA MASAHIRO

(54) COMPOSITION FOR DETECTING BIOLOGICAL SPECIMEN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a composition which can be used for the indirect agglutination (or passive agglutination) which is for measuring a specimen in biological sample.

SOLUTION: This micelle-containing composition uses a core shell type polymer micelle formed from a hydrophilic-hydrophobic block polymer as the carrier of an antigen, antibody, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-208754
(P2001-208754A)

(43) 公開日 平成13年8月3日(2001.8.3)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
G 0 1 N 33/53		C 0 1 N 33/53	U 2 G 0 5 4
C 0 8 L 101/14		C 0 8 L 101/14	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/26	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/26		1/68	A 4 J 0 0 2
1/68		C 0 1 N 21/78	C
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-16843(P2000-16843)

(22) 出願日 平成12年1月26日(2000.1.26)

(71) 出願人 593064629

片岡 一則

千葉県柏市大室1083-4

(72) 発明者 片岡 一則

千葉県柏市大室1083-4

(72) 発明者 長崎 幸夫

茨城県北利馬郡守谷町けやき台3-5-17

(72) 発明者 堀 裕佳

千葉県流山市東深井462-20 Uレジデンス202

(74) 代理人 100060782

弁理士 小田島 平吉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物学的な被検体を検出するための組成物

(57) 【要約】

【課題】 生物学的試料における被検体を測定するための間接凝集反応（または受動凝縮反応）に用いることのできる組成物の提供。

【解決手段】 親-疎水性ブロックポリマーから形成されるコア-シェル型高分子ミセルを抗原もしくは抗体等のキャリアーとするミセル含有組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 生物学的試料中に存在する被検体を検出するための親-疎水性ブロックポリマーを含む組成物であって、該被検体が非共有結合的に特異的結合対を形成する構成員の1員となりうるものであり、該ブロックポリマーがコア-シエル型高分子ミセルを形成しており、そして該高分子ミセルのシエルを形成する親水性ブロックに被検体と特異的結合対を形成しうる構成員の他の1員が共有結合して、かつ該高分子ミセルのコア部分に該ミセルの構造変化に応じて物理的特性が変化する化合物が配置されている、ことを特徴とする組成物。

【請求項2】 親-疎水性ブロックポリマーがポリエチレンセグメントからなる親水性ブロックを有する請求項1記載の組成物。

【請求項3】 親-疎水性ブロックポリマーがポリラクチドセグメントからなる疎水性ブロックを有する請求項1または2記載の組成物。

【請求項4】 高分子ミセルの構造変化に応じて物理的特性が変化する化合物が親-疎水性ブロックポリマーの疎水性ブロックに共有結合している請求項1～3のいずれかに記載の組成物。

【請求項5】 高分子ミセルの構造変化に応じて変化する物理的特性が蛍光強度である請求項4記載の組成物。

【請求項6】 特異的結合対が、抗原と抗体との対、ヒオチンとアビジンとの対、糖とレクチンとの対、ホルモンもしくはシグナル伝達物質と対応する受容体タンパク質との対、酵素とその基質もしくは阻害剤との対、および一定のヌクレオチド配列からなる核酸断片と該配列とストリンジェントな条件下でハイブッドを形成する核酸断片との対からなる群より選ばれた請求項1～5のいずれかに記載の組成物。

【請求項7】 (A) 被検体を含有することが疑われる生物学的試料と、親-疎水性ブロックポリマーから形成されたコア-シエル型高分子ミセルであって、親水性ブロックに被検体と特異的結合対を形成しうる1員が共有結合しており、そしてコア部分に該ミセルの構造変化に応じて物理的特性が変化する化合物が配置されている高分子ミセルとを混合する工程、

(B) 工程(A)で得られる混合物をインキュベートし、該高分子ミセルにおける特異的結合対を形成しうる1員と被検体との複合体の形成を介して該高分子ミセルの構造変化をもたらす工程、

(C) 高分子ミセルの構造変化により生じる物理的特性の変化を被検体の存在量と関連づける工程を含んでなる生物学的試料中の被検体の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は生物学的試料中に存

在する被検体を検出するための組成物および該被検体の検出方法に関する。

【0002】 本発明では、高分子ミセルおよび生物学的な特異的結合が利用される。

【0003】

【従来の技術】 血清学的診断において、間接凝集反応（または受動凝集反応）を利用した試験で、特異的抗体または特異的抗原の検出のために、抗体または抗原のキャリアーとして例えばベントナイト、ポリスチレンラテックスまたは赤血球もしくは細菌細胞等が使用されている。これらのうちポリスチレンラテックスは均一な大きさの粒子を作成しやすく、粒子自体に抗原性がない等の理由で間接凝集反応に広く利用されている。このポリスチレンラテックスはタンパク質等を強く吸着するという点で抗原または抗体を固定するのに優れているものの、逆に、反応系に混在する各種成分を非特異的に吸着して誤った結果を生じる可能性もある。さらに、正確な検出を可能にするには、試料中の抗体または抗原とラテックス粒子上の対応する抗原または抗体との免疫複合体の形成を介するラテックス凝集反応にある程度の時間をかける必要もある。また、粒子の凝集体を検出対象とするため、測定方法によってはバックグラウンドが高くなることもある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、生物学的試料中の被検体の検出に際し、上述の間接凝集反応系を初めとする各種測定系に利用でき、しかも、上記ポリスチレンラテックスの使用に伴う短所が存在しないか、あるいは解消された検出手段を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、各種の親-疎水性ブロックポリマーの提供と、それらの特徴付けおよび使用について検討してきた。このような研究の一環としての該ブロックポリマーの形成する高分子ミセルの安定性の検討から、ある一定条件下での高分子ミセルの凝集に伴う個別の高分子ミセルの構造の変化（究極的にはミセルの崩壊に至る）が高分子ミセル中に配置した一定の化合物により、迅速かつ感度よく追跡できることを見出した。

【0006】 さらに敷衍すれば、試料中の被検体を介して高分子ミセルが特異的に凝集または結合する場合には、高分子ミセルの構造変化を通して、被検体の存在を間接的に検出できることになる。本発明は、以上のような知見に基づき完成されたものである。

【0007】 したがって、本発明によれば、生物学的試料中に存在する被検体を検出するための親-疎水性ブロックポリマーを含む組成物であって、該被検体が非共有結合的に特異的結合対を形成する構成員の1員となりうるものであり、該ブロックポリマーがコア-シエル型高

分子ミセルを形成しており、そして該高分子ミセルのシエルを形成する親水性ブロックに被検体と特異的結合対を形成しうる構成員の他の1員が共有結合して、かつ該高分子ミセルのコア部分に該ミセルの構造変化に応じて物理的特性が変化する化合物が配置されている、ことを特徴とする組成物が提供される。

【0008】さらに別の態様の本発明として、(A)被検体を含有することが疑われる水性溶液と、親-疎水性ブロックポリマーから形成されたコア-シエル型高分子ミセルであって、親水性ブロックに被検体と特異的結合対を形成しうる1員が共有結合しており、そしてコア部分に該ミセルの構造変化に応じて物理的特性が変化する化合物が配置されている高分子ミセルとを混合する工程、(B)工程(A)で得られる混合物をインキュベートし、該高分子ミセルにおける特異的結合対を形成しうる1員と被検体との複合体の形成を介して該高分子ミセルの構造変化をもたらす工程、(C)高分子ミセルの構造変化により生じる物理的特性の変化を被検体の存在量と関連づける工程を含んでなる水性溶液中の被検体の検出方法も提供される。

【0009】

【発明の実施の態様】本発明で使用できる親-疎水性ブロックポリマーは、水性媒体中で高分子ミセルを形成し、本発明の目的に沿うものであれば、いかなる親-疎水性ブロックポリマーであってもよい。水性媒体としては、純水、緩衝化された水溶液、無機塩含有水溶液、エタノール、アセトン、ジメチルホルムアミド等の水混和性有機溶媒を含有する水溶液等を挙げることができる。本発明にいう高分子ミセルは、所謂、共重合体ミセルであって、水性媒体中でコア(主として、疎水セグメントからなる)-シエル(主として、親水性セグメントからなる)を形成するように会合した状態にあるミセルをいう。また、本発明の目的に沿うとは、少なくとも、水性媒体中では安定に存在しているが、2個以上の高分子ミセルどうしが、被検体を介して間接的に凝集した場合、凝集した高分子ミセルの最低1個に構造変化が生じる高分子ミセルが形成できる機能を有することを意味する。

【0010】このような親-疎水性ブロックポリマーとしては、当該技術分野で周知のものから選ぶことができ、特に、水に対して難溶性の薬物のキャリアー用に検討されてきたものが挙げられる。該ブロックポリマーは、具体的には、それぞれ線状の親水性ポリマーブロック(またはセグメント)と疎水性ポリマーブロック(またはセグメント)とを含んでなる構造を有するものである。

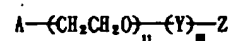
【0011】限定されるものでないが、親水性ポリマーブロックとしては、ポリエチレンオキシドもしくはポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン等の非荷電性のセグメントを本質的に含ん

でなるものが好ましく、これらのうち特に、ポリエチレンオキシドセグメントのみからなるものが好ましい。他方、疎水性ポリマーブロックとしては、ポリ(ラクチド)、ポリ(ρ -カプロラクトン)、ポリ(δ -バレロラクトン)、ポリ(γ -ブチロラクトン)、ポリ(β -ベンジルアスパラテート)、ポリ(γ -ベンジルグルタメート)、ポリ(バリ)、ポリ(ロイシン)、ポリ(メタクリル酸エステル)、ポリ(アクリル酸エステル)等を本質的に含んでなるものが好ましい。これらのうち、限定されるものでないが、特にポリ(ラクチド)セグメントのみからなるものが好ましい。本質的に含んでなることは、各ブロックの少なくとも95%が例示されているようなポリマーセグメントが占めるような場合を意味する。このような親水性ブロックと疎水性ブロックとの組み合わせとしては、いずれの組み合わせを含んでなるブロックポリマーであっても、本発明の目的に沿うものである限り、本発明にいう親-疎水性ブロックポリマーである。なお、本明細書で、ブロックポリマーの各セグメントを表示する際に使用している「ポリ」の語は、本発明の目的に沿うブロックポリマーを形成しうる限り、「オリゴ」の意味をも包含するものと理解されている。

【0012】以上のようなブロックポリマーは、例えば、WO93/16687、米国特許第5,410,016号、特開平6-107565号、WO96/33233、WO96/32434、またはWO97/06202に記載されているブロックポリマーをそのまま、あるいはさらに修飾して、使用する。特に、一般式

【0013】

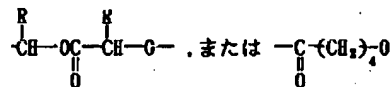
【化1】



【0014】(式中、Aは各種官能基を有する残基であり、Yは

【0015】

【化2】



【0016】であり、Zは各種官能基を有する残基であり、Rはアルキル基であり、そしてmおよびnは限定されるものでないが、独立して、5~2,000の整数をとり、当該ブロックポリマーが水性媒体中で高分子ミセルを形成しうる大きさである。)で表される、上記WO96/33233、WO96/32434またはWO97/06202に記載のブロックポリマーを修飾して使用するのが好ましい。修飾は、例えば、上記AまたはZ部分に存在しうる官能基、アルデヒド基(-CHO)、アミノ基(-NH₂)、メルカプト基(-SH)、水酸基(-OH)、カルボキシル基(-COOH)、ビニル基(-CH=CH₂)を介して行うことができる。

【0017】本発明に従えば、このようなブロックポリマーはコア-シエル型高分子ミセルの状態で使用され、そしてシエルを形成する親水性ブロックに被検体と特異的結合対を形成しうる構成員の他の1員（被検体に対して）が共有結合している。こうして、高分子ミセルのシエル内または表面に特異的結合対の1員が存在することになる。

【0018】特異的結合対は、水素結合、疎水結合、その他の非共有結合によって、生化学的な複合体やコンジュゲート等を形成しうる少なくとも2種の構成員からなり、特異的に結合しうるものであればいかなる構成員からなる対であってもよい。限定されるものでないが、このような対の具体的なものとしては、抗原-抗体、ビオチン-アビジン、糖とレクチン、ホルモンもしくはシグナル伝達物質-対応する受容体、酵素-その基質もしくは阻害剤、一定のヌクレオチド配列からなる（DNAもしくはRNA）断片-該配列とストリンジエントな条件下（例えば、HamersおよびHiggins、編、Nucleic Acid Hybridisation, IRL Press, Oxford, U. K. 参照）でハイブリッドを形成するDNAもしくはRNA断片、等を挙げることができる。したがって、本発明で用いられるブロックポリマーは、それらの親水性ブロック、特に、上記一般式のA部分に存在する官能基を介して、上記対を形成するいずれかの一員が共有結合されている。このような共有結合は、それ自体既知の方法、例えば縮合、付加置換、さらに必要により酸化もしくは還元反応を利用して形成することができる。

【0019】本発明にいう生物学的試料中に存在する被検体は、上記の特異的結合対を形成しうる構成員の1員であるから、対の具体的なものとして列挙したものはいずれか一方、例えば、抗原もしくは抗体等であることができる。生物学的試料とは、上記のような被検体を含有する可能性のあるものであれば、天然由来のものまたは人工的なものであってもよい。天然由来のものとしては、血液、尿、汗、唾液、あるいはこれらの希釈的もしくは濃縮物を挙げることができ、人工的なものとしては、動物もしくは微生物細胞の培養物、これらの細胞の破砕物、ペプチドもしくは核酸の合成混合物等を挙げることができる。このような生物学的試料は、必要により、適当な緩衝剤を使用して緩衝化した水性溶液であることができる。

【0020】本発明で使用するコア-シエル型高分子ミセルは、コア部分（または領域）に該ミセルの構造変化に応じて物理的特性が変化する化合物が配置される。物理的特性は、化合物をとりまく環境の変化による、例えば分子の電子状態、構造変化、媒質との相互作用の変化に影響を受ける吸光や発光の強度であることができる。このような物理的特性が変化する化合物の代表的なものとしては、発蛍光化合物や、2分子以上が隣接した状態

でエキシマーを形成することができる、ピレンもしくはその誘導体等の多環芳香族化合物を挙げることができる。発蛍光化合物は、免疫測定法の分野で常用されているものであって、特に、脂溶性の高いものであれば、いずれも使用できる。これらの化合物は、一般に、上述のようなブロックポリマーから高分子ミセルを形成する際の処理液中に共存させておくことにより、高分子ミセルのコア部分に配置することができる。理論に拘束されるものでないが、高分子ミセルのコア部分に上記のような化合物が濃縮しまたは隣接して存在している場合から、2個以上の高分子ミセルが被検体を介して凝集することにより個々の高分子ミセル構造が変化（究極的にはミセルの崩壊に至る）し、上記化合物が分散もしくは放出されると、蛍光強度の変化ないしはエキシマー発光が消失するなどの変化が生じる。本発明に従えば、通常、このような変化は室温（18〜27℃）で迅速に生じ、かつ顕著であるため極めて高感度である。

【0021】好ましい態様では、高分子ミセルの構造変化に応じて物理的特性が変化する化合物を、例えば、上記一般式のZ部分に存在する官能基を介してブロックポリマーの疎水性セグメントに共有結合させておき、その後、かようなブロックポリマーから高分子ミセルを形成することにより、該ミセルのコア部分に共有結合した状態で配置させることもできる。このような共有結合は、Z部分に存在する官能基を介して、その官能基と共有結合しうる官能基を有する上記化合物または、必要によりそのような官能基を導入した化合物を結合させるそれ自体既知の反応により形成できる。

【0022】以上のような高分子ミセルは、例えば、上述のWO96/33233、WO96/33234、WO97/06202に記載されている方法を初めとするそれ自体公知方法によって形成することができる。こうして形成された高分子ミセルは、必要により、脱塩、脱有機溶媒または緩衝化された水溶液として本発明の組成物とすることができる。このような組成物は、一般にナノサイズのミセルからなり、透明であるので、バックグラウンドの低下がもたらされる。

【0023】本発明によれば、上記組成物を使用する生物学的試料中の被検体の検出方法が提供される。該方法によれば、まず、被検体を含有することが疑われる生物学的試料と上記組成物とを混合し、インキュベートする。この混合は、吸光ないしは蛍光強度測定機能を設けた分析装置に付属するキュベットやマイクロタイターのウエル内で行うことができる。これらの装置は当該技術分野で常用されているものを普通の様式でそのまま使用することができる。

【0024】こうして、試料中に、高分子ミセルのシエル部分に存在する特異的結合対を形成しうる構成員の1員と結合しうる被検体が存在すれば、2つ以上の高分子ミセルは被検体を介して間接的に凝集反応を起こし、そ

の結果、個々のミセルは構造変化を起こす。次に、このような構造変化により、例えば、高分子ミセルのコア部分に配置した発蛍光化合物ないしはピレン等の多環芳香族化合物の物理的特性、例えば蛍光強度の上昇ないしはエキシマー発光の消失等の変化を測定し、その測定値を試料中の存在量と関連付けることができる。

【0025】こうして本発明の被検体の検出方法によれば、生物学的試料中の抗原もしくは抗体、その他の生物学的に特異的な複合体もしくはコンジュゲートを形成するいずれか一方の構成員を迅速、かつ高感度で検出することができる。

【0026】

【実施例】以下、本発明を、特定の例を用いて説明するが、本発明はこれらに限定されるものでない。

【0027】例1：ブロックポリマーの調製

(1) Acetal-PEG/PLA-OHの調製

アルゴン下の受器中にテトラヒドロフラン (THF) 20mlを加え、開始剤として3,3-ジエトキシ-1-プロパノール (0.1mmol)、メタル化剤としてカリウムナフタレン (0.1mmol)を用いて10分間メタル化した。この溶液にエチレンオキシド (114mmol)を加え、室温で2日間攪拌し、次いでラクチド (35mmol)を加え室温で3時間攪拌した後、開封して反応を停止した。ポリマーの精製は、反応液を冷イソプロパノールに加えてポリマー (Acetal-PEG/PLA-OH)を沈殿させ、さらに冷イソプロパノールを用いる再沈により行った。溶媒を留去し、残渣をベンゼンに溶かし、凍結乾燥を行ってポリマーを回収した。精製後の収率は約85%であった。ポリエチレンセグメント (PEG) およびポリラクチドセグメント (PLA)の分子量は、それぞれ5,000および5,500であった。

【0028】(2) Acetal-PEG/PLA-Py (ピレン)の調製

アセトニトリル100mlの入った受器にAcetal-PEG/PLA-OH (0.03mmol)、キヌクリジン (ポリマーに対して約50倍量)、ピレン-1-カルボニルシアニド (ポリマーに対して約17倍量)を加え60℃で1時間攪拌した後、ジメチルスルホキシド (DMSO) 透析 (透析膜：分画分子量1000、1日当り一回DMSOを交換)を4日間、水透析 (透析膜：分画分子量1200-14000、蒸留水を2回交換)を1日行い、凍結乾燥で溶媒を除去し、THFに溶解させエーテル再沈を行ない沈殿物を吸引濾過により回収し、ベンゼンに溶かし凍結乾燥し、標題のポリマーを回収した。収率は約70%であった。

【0029】(3) Acetal-PEG/PLA-Py ミセルの調製

ジメチルアセトアミド (DMAc) 30mlにAcetal-PEG/PLA-Pyを溶かし、水透析 (透析膜：分画分子量12000-14000、蒸留水を、2、5および8時間後に交換)を1回行った。

【0030】(4) Biotin-PEG/PLA-Py ミセルの調製

上記Acetal-PEG/PLA-Pyミセル溶液を塩酸によりpH2に調整し、2時間半脱保護反応を行った。その後、水酸化ナトリウムを用いて、pH5とし脱塩透析 (透析膜：分画分子量12000-14000、蒸留水を2時間後に交換)を1日行った。回収したアルデヒド化したミセル濃度を2mg/mlに調整した後、ビオチン-ヒドラジド (ポリマーに対して1.5倍量)を加え、50℃で5時間反応させ、水透析 (透析膜：分画分子量1000、蒸留水を1日当り一回交換)を50℃で3日間行い回収した。

【0031】例2：biotin-PEG-PLA-Py ブロックポリマー100mgを20mlのDMAcに溶解させ、2Lの水に対して24時間透析した (3、6、9時間後に水を交換)。(MWC0=12K~14K)このようにして得られた表面にビオチンを有し、コアにピレンを有するPEG-PLAコア-シエルミセルをリン酸緩衝液 (pH=7.4、イオン強度0.2M)で0.1mg/mlに調製した。この溶液3mlに同サイト量のアビジンのPBS溶液を加え、蛍光を測定したところ、420nmの蛍光強度が1.2から6に上昇した。また、500nmのエキシマー発光が消失した。アビジンの混合前後における蛍光スペクトルを図1に示す。

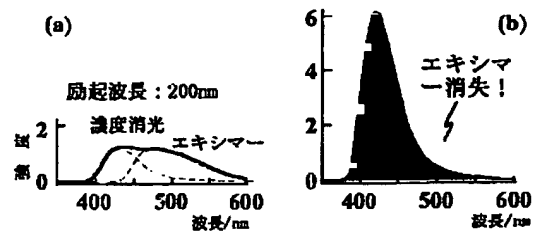
【0032】例3：例2と同様にして調製したbiotin-PEG-PLA-Pyブロックポリマーミセル溶液3mlに30μlの抗ビオチン抗体 (50mM、PBS pH=7.4)を加え、蛍光を測定したところ、420nmの蛍光強度が1.2から6.5に上昇した。また、500nmのエキシマー発光が消失した。

【0033】例4：ガラクトース-PEG-PLA-Pyを用いる以外は例2と同様にしてミセルを調製し、この溶液3mlに10倍モル量のレクチンタンパク (ヒマ豆)のPBS溶液を加え、蛍光を測定したところ、420nmの蛍光強度が1.2から6.3に上昇した。また、500nmのエキシマー発光が消失した。

【図面の簡単な説明】

【図1】高分子ミセル [ビオチン-PEG-PLA-ピレンのミセル] とアビジンを接触させる前 (a) および後 (b) における蛍光スペクトルを示す。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 33/544	Z
33/544		33/545	A
33/545		33/566	
33/566		C 1 2 N 15/00	A
(72)発明者 秋山 誠祐		F ターム(参考)	2G054 AA10 EA03 EA07 GA04 GB02
千葉県流山市東深井202-1 メリディア			4B024 AA11 CA01 CA11 HA14
ンV203			4B063 QA01 QQ03 QQ05 QQ15 QQ21
			QQ42 QQ52 QQ79 QQ96 QR41
			QR57 QR66 QS34 QS36 QX02
			4J002 AA001 BE021 BG041 BG051
			CF191 CH051 CL011 GD02